

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON DNA-MARKIERUNGSMOLEKÜLEN

BMWi INNO-KOM 49MF170074 | Laufzeit: 01.2018 – 06.2020 | Birgit Voigt, FILK Freiberg

Categories: Biogenic Raw Materials Methods/Processes

AUSGANGSSITUATION

Die Fälschung von Produkten ist ein großes Problem im globalen Handel. Um Fälschungen zu erkennen und nachzuweisen, werden Verfahren gebraucht, mit denen Gegenstände und Materialien sicher markiert werden können. Markierungssysteme können u. a. auf der Basis von DNA entwickelt werden. Damit sind auch flächige Materialien wie Leder, Kunstleder und Textilien markierbar. Zur Entwicklung und Anwendung solcher Systeme werden große Mengen DNA gebraucht. Es besteht daher Bedarf, DNA in großem Maßstab preiswert herzustellen.

PROJEKTZIEL

Die biotechnologische Herstellung von DNA (in Form von Plasmiden) mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mikroorganismen ist gut etabliert und relativ kostengünstig. Bisher wird die hergestellte DNA für medizinische Zwecke verwendet. Aus Sicherheitsgründen können die verwendeten Stämme nicht für die Produktion von DNA zur Markierung von Material eingesetzt werden. Im Projekt sollten deshalb ein neuer bakterieller Produktionsstamm, Produktionsplasmide und ein Verfahren für die Herstellung großer Mengen spezifischer DNA-Markierungsmoleküle entwickelt werden.

LÖSUNGSWEG

Für das Markierungssystem wurden 20 DNA-Moleküle mit einer Länge zwischen 30 und 220 Basenpaaren bereitgestellt, die in frei kombinierbaren Mischungen genutzt werden können. Zur Herstellung sollten die DNA-Markierungsmoleküle einzeln in ein Plasmid mit hoher Kopiezahl kloniert und anschließend in den zu entwickelnden bakteriellen Produktionsstamm eingebracht werden. Da Plasmide in bakteriellen Zellen nur stabil erhalten bleiben, wenn die Zellen einem Selektionsdruck ausgesetzt sind, sollte ein Plasmid-Addiction-System entwickelt werden. Dazu wird zunächst auf dem Plasmid eine Kopie eines essentiellen Genes platziert. Wird dieses Gen anschließend aus der chromosomalen DNA des Bakteriums deletiert,

kann der Stamm nur wachsen, solange das Plasmid vorhanden ist. Damit sollten Produktionsstämme entstehen, die ohne Antibiotika als Selektionsmittel kultiviert werden können und mit denen große Mengen der DNA-Markierungsmoleküle hergestellt werden können.

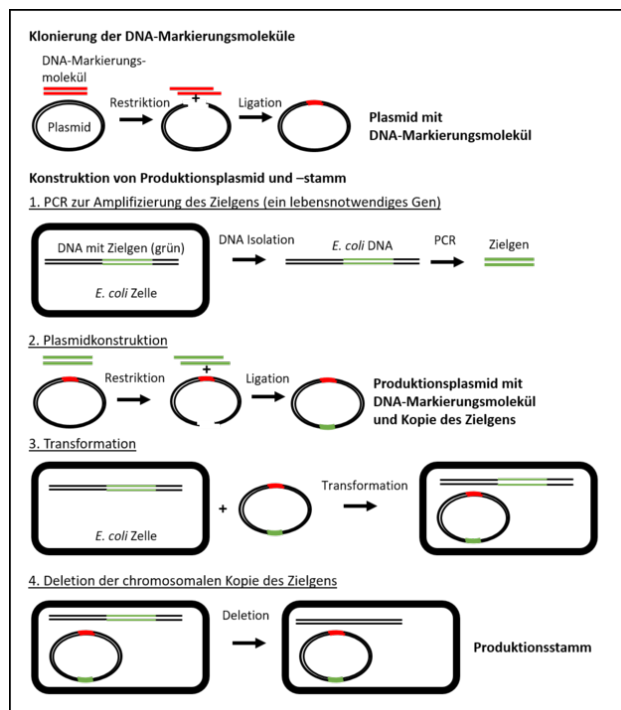


Abb.: Konstruktion von Produktionsplasmiden und -stämmen mit einem Plasmid-Stabilisierungssystem: Zunächst wird das DNA-Markierungsmolekül in das Plasmid integriert. Im zweiten Schritt wird eine Kopie eines lebensnotwendigen Gens (Zielgen) in das Plasmid eingefügt. Zur Konstruktion des Produktionsstamms wird das Plasmid in die Zellen gebracht. Anschließend wird die genomische Kopie des Zielgens aus dem Genom ausgeschnitten. Damit kann die Zelle ohne Plasmid nicht überleben.

ERGEBNISSE

Es wurden 20 DNA-Markierungsmoleküle ausgewählt und die Nachweisbarkeit mit den designten Primern bestätigt. Die Moleküle konnten über das PCR-Verfahren, nicht aber über die Integration in ein Plasmid vermehrt werden. Damit lassen sich kleintechnische Versuche, nicht aber die großvolumige Markierung von Produkten realisieren. Zur Entwicklung eines Verfahrens wurde das Wachstum plasmidtragender E. coli-Stämme und ihre Plasmidproduktion unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Es wurde u. a. der Einfluss des Mediums, der Kohlenstoffquelle und des Temperaturregimes untersucht. Die erzielten Plasmidausbeuten entsprachen den Mengen, wie sie für Schüttelkolbenversuche durchschnittlich erreicht werden. In diesen Versuchen enthielten die Plasmide nicht die gewünschte DNA. Die Versuche können jedoch als Basis für die Entwicklung von Fermentationsprozessen genutzt werden. Da es im Lauf des Projektes trotz zahlreicher Versuche mit unterschiedlichen Methoden nicht gelang, die Plasmide mit Ziel-DNA zu konstruieren, konnte der letzte Schritt, die Deletion eines essentiellen Gens und die Stammkonstruktion, nicht durchgeführt werden. Die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung großer Mengen DNA-Markierungsmoleküle blieb deshalb unvollständig.

DANKSAGUNG

Das Forschungsvorhaben „Verfahren zur Herstellung von DNA-Markierungsmolekülen“, Reg.-Nr.: 49MF170074 wurde anteilig vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie (BMWi) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages innerhalb des Förderprogramms „FuE-Förderung gemeinnütziger externer Industrieforschungseinrichtungen – Innovationskompetenz (INNO-KOM) – Modul Marktorientierte

Forschung und Entwicklung (MF)“ über den Projektträger EuroNorm GmbH gefördert. Wir bedanken uns für die gewährte Unterstützung.

Gefördert durch:



INNO-KOM

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages